

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Februar 2004 (05.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/011019 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 38/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008205
- (22) Internationales Anmeldedatum:
25. Juli 2003 (25.07.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 33 929.5 25. Juli 2002 (25.07.2002) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): CHARITE-UNIVERSITÄTS MEDIZIN BERLIN [DE/DE]; Schumannstrasse 20/21, 10117 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): STANGL, karl [DE/DE]; Ballenstedter Str. 12, 10709 Berlin (DE). MEINERS, Sike [DE/DE]; Essener Str.2, 10555 Berlin (DE). HOCHER, Berthold [DE/DE]; Ernst-Thälmann-Str. 151 a, 14532 Kleinmachnow (DE).
- (74) Anwalt: KRAUSS, Jan, B.; Boehmert & Boehmert, Pettenkoferstrasse 20-22, 80336 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/011019 A1

(54) Title: USE OF A PROTEASOME INHIBITOR IN THE TREATMENT OF FIBROTIC DISEASES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES PROTEASOM-INHIBITORS ZUR BEHANDLUNG FIBROTISCHER ERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of at least one proteasome inhibitor, preferably in the form of a threonine protease inhibitor, in the treatment of fibrotic diseases, especially fibrotic diseases of the cardiovascular system.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung mindestens eines ProteasomInhibitors, vorzugsweise in Form eines Threoninproteaseinhibitors, zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen, insbesondere des kardiovaskulären Systems.

**Verwendung eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung
fibrotischer Erkrankungen**

- 5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung mindestens eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen insbesondere des kardiovaskulären Systems.

Die Myokardfibrose ist eine Antwort auf die Überlastung des Herzmuskels, welche beispielsweise durch Bluthochdruck, Herzinfarkt oder Kardiomyopathien verursacht wird. Zu diesem Phänomen tragen zahlreiche pathophysiologische Mechanismen bei, wie etwa die Proliferation von Herzbindegegewebszellen, die zu einer erhöhten Matrixbildung führen. Funktionelle Endzustände sind die Massenzunahme des Herzmuskels und ein verstärkter bindegewebiger Umbau (Fibrose).
10 Ein Kennzeichen des Umbaus am Herzen ist somit die interstitielle Fibrose, welche zu einer erhöhten Steifheit der Herzwände führt. Dies mündet funktionell in eine diastolische Dysfunktion, die die Herzmuskelschwäche weiter verschlimmern kann. Teilweise werden diese Effekte durch eine verstärkte Expression von Genen verursacht, die für extrazelluläre Matrixproteine, wie Collagen I und III, die dominanten Kollagene des Herzmuskels, kodieren.
15

Die zur Zeit am besten etablierte Strategie zur Verringerung der Herzfibrose besteht in der pharmakologischen Inhibierung des Renin-Angiotensin-Systems, beispielsweise durch ACE-Inhibitoren oder Angiotensin II-Blocker. Diese Substanzen haben jedoch den Nachteil, dass sie in wenigstens 5% der Fälle zu Unverträglichkeiten bei den Patienten führen. Weiterhin wirken sie nur auf die durch das Renin-Angiotensin-System vermittelte Herzfibrose und nicht auf die durch andere Agonisten wie etwa durch TGF-beta (transforming growth factor beta) oder Endothelin-1 vermittelte Entwicklung einer myokardialen Fibrose. Es besteht daher der

- 2 -

Bedarf an alternativen Methoden, die eine Herzfibrose verringern oder vermeiden können.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass eine Inhibierung des Proteasom-
5 systems effektiv eine Herzfibrose verringern bzw. vermeiden kann, was zu einer verbesserten Herzfunktion führt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung mindestens eines Proteasom-Inhibititors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen. Die fibrotischen Erkrankungen können unterschiedlichste Organsysteme, wie Lunge, Leber, Haut, Gelenke, Skelett und/oder Drüsen betreffen. Insbesondere bezieht sie sich auf fibrotische Erkrankungen des kardiovaskulären Systems.
10

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist der Hauptstoffwechselweg für den Abbau von intrazellulären Proteinen in eukaryontischen Zellen, wie z.B. von Signalmediatoren, Zellzyklusproteinen und Transkriptionsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung des Proteasoms die zelluläre Proliferation blockiert, mit verschiedenen Signalwegen interferiert und die Genexpression beeinflusst (Lee, D. H. et al. (1998) Trends Cell Biol., 8397-403; Yu C.-L. et al. (1997) J. Biol. Chem., 272, 14017-14020; Heldin C.-H. et al. (1999) Nat. Cell Biol., 1, E195-E197 und Desterro, J. M. P. et al., (2000) Cell Mol Live Sci., 57, 1207-1219).
15
20

Als Proteasom-Inhibitoren sind zum einen niedermolekulare organische Verbindungen und zum anderen molekularbiologische Verbindungen geeignet, die vorzugsweise im wesentlichen spezifisch das Proteasom inhibieren. Der Inhibitortest kann beispielsweise wie bei Dahlmann B. et al. (2000) J. Mol. Biol., 303, 643-653 beschrieben durchgeführt werden. Der Begriff „im wesentlichen spezifisch“ gemäß der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass der Inhibitor das Proteasom stärker inhibiert als andere intrazelluläre Proteasen, wie z. B. Calpain, Cathepsine oder TPPII, vorzugsweise ca. 10mal stärker, insbesondere ca. 100mal stärker, vor allem ca. 1000mal stärker inhibiert als andere intrazelluläre Proteasen.
25
30

Die Inhibitionswerte werden üblicherweise als IC₅₀ (Konzentration des Inhibitors bei 50%iger Inhibition) angegeben und miteinander verglichen. Als niedermolekulare organische Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung versteht man organische Verbindungen mit einer relativen Molmasse von kleiner gleich 1000,
5 vorzugsweise kleiner gleich 800. Als molekularbiologische Verbindungen versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, insbesondere RNA oder DNA, die die Expression einer Komponente des proteasomalen Systems inhibieren, beispielsweise die Transkription oder Translation der Proteasom-kodierenden Nukleinsäuren, oder Proteine, insbesondere Bindeppteide oder
10 -proteine, gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems, vorzugsweise gegen Ubiquitin und/oder gegen das Proteasom. Beispielsweise ist die Nukleinsäure eine anti-sense-RNA oder eine Doppelstrang-RNA (dsRNA) gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz, ein Duplex-bildendes Oligonukleotid gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz und/oder ein Knock-out-Konstrukt gegen
15 eine Proteasom-kodierende Sequenz. Als Bindeppteine oder -peptide eignen sich beispielsweise Antikörper oder ihre bindeaktiven Teile, z. B. einzelkettige Antikörper (scAb) oder Fab-Fragmente, oder Derivate davon, z.B. bispezifische Antikörper, gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems. Eine Beschreibung des proteasomalen Systems und geeigneter Proteasom-Inhibitoren
20 findet sich beispielsweise in Kisseelev A. F. & Goldberg A. L. (2001) Chemistry & Biology, 8, 739-758.

Demzufolge eignen sich als Proteasom-Inhibitoren insbesondere Threoninprotease-Inhibitoren, Serinprotease-Inhibitoren und/oder Cysteinprotease-Inhibitoren,
25 vor allem ein Peptid-Aldehyd, ein Peptid-Boronat, ein Peptid-Vinylsulfon, ein Peptid-Epoxyketon, ein Lactacystin, ein Peptid-alpha-Ketoaldehyd, ein alpha-Ketoamid, ein Indanonpeptid, ein Polyalkylenaldehyd und/oder ein Polyphenol, insbesondere ein Cathechin-3-gallat, welches z.B. aus grünem Tee gewonnen werden kann. Vor allem eignet sich der Proteasominhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al
30 (MG132), Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al (PSI), CEP1612, Pyrazylcarbonyl-Phe-Leu-boronat (PS-341), Dansyl-Phe-Leu-boronat (DFLB), Morpholinonaphthyla-

Ianin-Leu-boronat (MG273), NIP-Leu₃-vinylsulfon (NLVS), Tyr-Leu₃-VS, NIP-Leu-Leu-Asn-VS, Ada-Tyr-Ahx₃-Leu₃-VS, Ada-Lys(Bio)-Ahx₃-Leu₃-VS Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-EX (Epoxomicin), Dihydroeponemycin, Lactacystin, clasto-Lactacystin-beta-lacton (Omuralid), PS-519, Ac-Leu-Leu-Nle-al (ALLN),
5 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI), 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (Pe-fablock SC), TMC-95A, Gliotoxin, (-) Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Ritonavir, Lovastatin, Aclacinomicin A (Aclarubicin) und/oder Cyclosporin, die alle in Kisseelev A. F. & Goldberg A. L. (2001, supra) und in Fig. 3 näher beschrieben sind, und worin Z eine Benzyloxycarbonylgruppe, al eine Aldehydgruppe, VS
10 eine Vinylsulfongruppe, NIP eine 3-Nitro-4-hydroxy-5-iodophenylacetat-Gruppe und Bio eine Biotingruppe bedeutet. Besonders bevorzugt von allen Verbindungs-klassen sind Threoninproteaseinhibitoren und davon insbesondere die Verbindun-gen MG132, MG262, Lactacystin und/oder Epoxomicin, vor allem MG132 und/oder MG262.

15

Gemäß der vorliegenden Erfindung wurden die Auswirkungen der Proteasom-Inhibierung auf die Herzfibrose in spontan hypertensiven Ratten (SH-Ratten) stu-diert. Überraschenderweise wurde bei einer Langzeitbehandlung über 12 Wochen mit dem spezifischen Proteasom-Inhibitor MG132 bei einer täglichen Dosis von 1
20 mg pro kg eine deutliche Inhibierung der Herzfibrose von ca. 40% festgestellt, wobei der Inhibitor sehr gut vertragen wurde. Die beschriebenen Effekte resultier-ten in einer verbesserten ventrikulären Funktion in den MG132-behandelten Tie-ren. In vitro wurde eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Wachstums kardialer Fibroblasten und eine spezifische, konzentrationsabhängige Herabregu-lierung von Collagen Iα2 zu ca. 75% und von Collagen IIIα1 von ca. 90% beob-achtet. Obwohl bei einer systemischen Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren als
25 Inhibitoren eines zentralen zellulären Systems Zytotoxizität zu erwarten gewesen wäre, wurden bei der beschriebenen Langzeitbehandlung keine messbaren Ne-benwirkungen festgestellt, sondern im Gegenteil eine gute Verträglichkeit konsta-tiert. Somit eignen sich Proteasom-Inhibitoren in bevorzugter Weise zur Behand-lung fibrotischer Erkrankungen insbesondere des kardiovaskulären Systems.
30

- 5 -

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf die Behandlung von Patienten mit einer fibrotischen Erkrankung, vorzugsweise einer Fibrose des kardiovaskulären Systems. Dabei ist sowohl eine systemische wie lokale Applikationsform möglich.

5 Die folgenden Methoden und Ergebnisse mit den Figuren 1 bis 3 sollen die Erfin-
dung beispielhaft näher beschreiben, ohne sie darauf zu beschränken.

10

Beschreibung der Figuren:

15 **Figur 1** beschreibt die Auswirkungen einer MG132 Behandlung von SH-Ratten auf die Herzfibrose bestimmt durch quantitative Morphometrie von Sirius-Rot-gefärbten links-ventrikulären mikroskopischen Schnitten (Abb. 1A-1C) und auf die Herzfunktion (Abb. 1D-1F).

20 **Figur 1A** zeigt einen repräsentativen Schnitt durch das Herz einer unbehandelten Kontroll-SH-Ratte, die eine gesteigerte myokardiale Fibrose zeigt. Das fibrotische Gewebe ist mit Sternchen beispielhaft markiert. Der Balken entspricht 20 µm.

25 **Figur 1B** zeigt einen typischen Schnitt durch das Herz eines MG132 behandelten Tieres, welches eine deutlich verringerte Herzfibrose unter Inhibition des Proteasoms zeigt.

25

Figur 1C zeigt die quantitative Auswertung mittels computerunterstützter Bildanalyse. Dabei ergibt sich eine um ca. 40% verringerte Herzfibrose unter MG132-Behandlung. Mittelwert ± S.E.M. (standard error of mean = Standardabweichung/Wurzel aus n), n=7-10; *:p<0.05.

30

- 6 -

Figur 1D zeigt die enddiastolischen Drücke (LVEDP) im linken Ventrikel der Ratten mit deutlich verringertem Druckniveau bei den MG132-behandelten Tieren. Mittelwert \pm S.E.M., n=6-10, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

- 5 **Figur 1E** zeigt die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}), die bei den MG132-behandelten Tieren deutlich höher ist. Mittelwert \pm S.E.M., n=6-10, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

- 10 **Figur 1F** zeigt die maximale Druckabfallgeschwindigkeit (dp/dt_{min}), die unter MG132 Behandlung um Faktor 2 höher ist. Mittelwert \pm S.E.M., n=6-10, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

Figur 2 zeigt die Auswirkungen von Proteasom-Inhibitoren auf die Proliferation und Kollagenexpression in primären Herzfibroblasten der Ratte.

- 15 **Figur 2A** zeigt die dosisabhängige Inhibierung der Proliferation durch MG132. Die Zellen wurden mit 0,1 μ M und 1 μ M MG132 oder 0,1% DMSO stimuliert und täglich gezählt. Mittelwert \pm S.E.M., n=3.

- 20 **Figur 2B** zeigt die Quantifizierung der mRNA-Menge der Kollagene I α 1, I α 2 und III α 1 mittels „real-time“ PCR-Analyse. Unter MG132-Behandlung kommt es dosisabhängig zu einer dramatischen Senkung der Expression von Collagen I α 2 und III α 1. Mittelwert \pm S.E.M., n=2.

- 25 **Figur 3A und B** zeigen die chemische Struktur verschiedener Proteasom-Inhibitoren.

Figur 4 zeigt eine real-time PCR-Analyse der Expression von MMP2 und MMP9 und der Kollagene I α 1, I α 2 und III α 1 unter basalen Bedingungen (Fig. 4C bzw.

Fig. 4D), sowie bei der Kostimulation mit MG132 und IL- β (Fig. 4A bzw. Fig. 4B).

5 **Figur 5** zeigt Zymographie-Experimente zum Nachweis von aktivem MMP2 und
MMP9 unter basalen Bedingungen (Fig. 5A), bzw. bei der Kostimulation mit Pro-
teasom-Inhibitor und IL- β (Fig. 5B).

Figur 6 zeigt eine Bandshift-Analyse zum Nachweis von aktivem NF κ B in Kern-
extrakten nach Stimulation mit MG132 und/oder mit IL- β .

10

Methoden

Methode 1: Gewinnung von Herzfibroblasten

15 Herzfibroblasten wurden aus neonatalen Wistar-Ratten durch Plattieren der Nicht-
Myozyten Fraktion von neonatalen Herzen präpariert. Die Herzen wurden 2-3
Tage alten neonatalen Ratten entnommen. Ventrikuläres Gewebe wurde mit 50
mg pro ml Trypsin in Hanks-Balanced Salt Saline (HBSS) (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei,
Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) über Nacht bei 4°C und mit Kollagenase
20 (0,5 mg pro ml) in Leibowitzmedium (L-15, Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland)
für 45 Minuten bei 37°C behandelt. Nach dem Waschen wurden die Zellen
für eine Stunde bei 37°C vorplattiert. Die adhärenten Zellen waren hauptsächlich
Herzfibroblasten, die unter Standardbedingungen in Standard-M199-Medium mit
10% Neugeborenenkalbserum, L-Glutamin und Penizillin-Streptomycin (Invitro-
25 gen™, Karlsruhe, Deutschland) weiterkultiviert wurden. In den Experimenten
wurden subkultivierte Fibroblasten der Passagen 3-7 verwendet.

Methode 2: Proliferationstest

MG132, ALLM und MG262 wurden von Calbiochem® (San Diego, Californien,
30 USA) gekauft und als 10 mM DMSO-Stammlösungen bereitgestellt.

Herzfibroblasten (5×10^4 Zellen pro ml) wurden auf 24 Lochplatten ausgesät. Adherente Zellen wurden entweder mit MG132 (0,1 und 1 μM) oder DMSO (0,1%) in Medium mit 10% Serum stimuliert und weiter für 7 Tage kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Proliferation wurde dadurch bestimmt, dass täglich die lebenden Zellen in dreifacher Ausfertigung mittels Trypan-Blau-Ausschlußmethode gezählt wurden. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen: Der Farbstoff Trypanblau, mit dem die Zellen versetzt werden, kann nur in Zellen mit einer defekten Zellmembran eindringen, die sich daraufhin blau färben. Lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran werden nicht angefärbt.

Methode 3: Histologische Bestimmung der Fibrose

Für die pathohistologische Evaluierung wurden die Rattenherzen in Paraffin eingebettet, in 3 μm dicke Schnitte zerteilt, einer Hämatoxylin-Eosin- und Sirius-Rot-Färbung unterworfen und wie in Hocher, B. et al., (1999), Hypertension, 3, 816-822 beschrieben, analysiert. Das Ausmaß der Herzfibrose wurde durch quantitative Morphometrie der Sirius-Rot-gefärbten Schnitte mit einem Bildanalyse-system (Quantimed 500, Image 1.61 Programm) evaluiert. Hierbei wurde das Verhältnis von rot gefärbtem Gewebe (Bindegewebe) gegen das Gesamtgewebe des Schnittes bestimmt.

Methode 4: RNA und RT-PCR-Analyse

Gesamt-RNA wurde mittels Trizolreagenz (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) extrahiert. Anschließend wurde die RNA revers transkribiert (AMF Reverse Transkriptase, Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland) und mit DNase behandelt (Ambion, Huntingdon, UK). Es wurden PCR-Primer für die Rattenkollagen-RNAs I α 1, I α 2, III α 1, für die RNAs der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 2 und 9 und für das „housekeeping“ Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) mit der Primerexpresssoftwareversion 1.2 (PerkinEl-

mer/Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA) entworfen und von TIB Molbiol, Berlin, Deutschland gekauft. Die PCR-Reaktion wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers mit SybrGreen in einem ABI PRISM 5700 Sequenzdetektor (PerkinElmer/Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA) durchgeführt. Die relative 5 Quantifizierung wurde mittels der vergleichenden C_T-Methode, wie vom Hersteller beschrieben, durchgeführt.

Methode 5: Tierstudien

Altersgleiche männliche SH-Ratten wurden vom Jackson Laboratory, Maine, 10 USA erhalten. Die Tiere wurden gemäß den internationalen Richtlinien für die Pflege und Verwendung von Labortieren gehalten. 6 Wochen alte Ratten wurden mit MG132 (1 mg pro kg Körpergewicht), 0,1% DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder physiologischer Kochsalzlösung (n=10 pro Gruppe, tägliche intraperitoneale Injektionen) für 12 Wochen behandelt. Die Tiere wurden mit einer Hoch- 15 salzdiät gefüttert (Trinkwasser mit 2% Natriumchlorid). Der Blutdruck wurde wöchentlich mit Hilfe der Standard-Schwanzmanschetten-Methode gemessen. Die Blutwerte und Standardlabormarker der renalen und hepatischen Funktionen wurden 6 Wochen nach der Behandlung und am Ende der Studie durch Standardmethoden bestimmt. Am Ende der Studie wurden die Tiere mittels einer intraperito- 20 nealen Injektion einer 20%igen Urethanlösung (0,9 g pro kg Körpergewicht) anästhesiert und die links-ventrikulären Druckparameter wie bei Saragoca, M. et al. (1981) Hypertension, 3, 380-385 beschrieben, bestimmt. Die Organe wurden entfernt, gewogen und entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in Paraffin für die histologische Analyse eingebettet. Da keine Differenz zwischen 25 DMSO- und salzbehandelten SH-Ratten bezüglich der oben genannten Parameter beobachtet wurde, dienten die DMSO-behandelten Tiere als Kontrolle für die MG132-Behandlung.

Die Daten wurden als Mittelwerte ± S.E.M. bestimmt, sofern nichts anderes ver- 30 merkt wurde. Die Signifikanz der Differenz in den links-ventrikulären Druckpa- rametern und in der Quantifizierung der Herzfibrose wurden nach dem Student's

- 10 -

T-Test bestimmt. Für den Zellproliferationstest wurde die Signifikanz durch Vergleich der Regressionskoeffizienten von MG132 gegen die Kontrollgruppe gemessen. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Für alle statistischen Kalkulationen wurde die SPSS 9.0 Software benutzt.

5

Ergebnisse

Die Behandlung von spontan hypertensiven Ratten mit dem spezifischen Proteasom-Inhibitor MG132 über 12 Wochen wurde im Allgemeinen über diese langen Zeitraum gut vertragen. In nach 6 Wochen und am Ende der Studie genommenen 10 Blutproben wurden keine Veränderungen im Differentialblutbild oder eine Veränderung der Labormarker, die Nebenwirkungen der Niere oder Leber zeigen, beobachtet. Darüber hinaus zeigten die MG132-behandelten Tiere keine signifikante Änderung im systolischen Blutdruck und im Herzgewicht (Tabelle 1).

15 Tabelle 1

	Kontrolle	1 mg/kg MG132
Systolischer BD (mm Hg)	196,75±9,1	191,43±11,2
20 Körpergewicht (g)	286±36,6	280±15,3
Herzgewicht (g)	1,28±0,07	1,18±0,07
HG/KG(mg/g)	4,64±0,61	4,1±0,34

BD steht für Blutdruck; KG für Körpergewicht und HG für Herzgewicht

25

Wie aus den Figuren 1A bis 1C ersichtlich ist, zeigten MG132 behandelte SH-Ratten eine deutliche Reduktion (-38%) der Herzfibrose verglichen mit den Kontrolltieren bestimmt durch quantitative Morphometrie von Sirius-Rot gefärbten Sektionen der linken Ventrikel.

30

Die Prävention der Herzfibrose in MG132-behandelten SH-Ratten korrelierte gut mit der normalen links-ventrikulären Funktion, wobei die Kontrollen Anzeichen einer beginnenden links-ventrikulären Dysfunktion zeigten, wie in den Figuren 1D-1F dargestellt: Die Füllungsdrücke (LVEDP) waren deutlich niedriger, (Figur 5 1D: 15 ± 2 versus 5 ± 3 mm Hg, $p=0,017$), die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit dp/dt_{max} (Figur 1E: 8010 ± 538 versus 3375 ± 662 mm Hg, $p=0,003$) und die maximale Druckabfallgeschwindigkeit dp/dt_{min} (Abb. 1F: -5046 ± 726 versus 10 -2290 ± 422 mm Hg/s, $p=0,015$) - die Parameter der Herzinotropie und Herzlu- sitropie sind - waren mehr als doppelt so hoch in den MG132-behandelten SH- Ratten verglichen zu den Kontroll-SH-Ratten.

Um mögliche Mechanismen aufzuklären, wie die Proteasom-Inhibierung zu der verringerten Herzfibrose *in vivo* beitragen kann, wurden primäre Herzfibroblasten der Ratte mit Proteasom-Inhibitoren behandelt. Wie in Figur 2A dargestellt, ver- 15 ursachte die Behandlung von Herzfibroblasten mit 0,1 und 1 μ M MG132 eine Dosis-abhängige Inhibierung der Proliferation. Darüber hinaus wurde die RNA- Expression von Collagen I α 2 und III α 1 in dosisabhängiger Weise durch MG132 bis zu -73 % und bis zu 91% inhibiert (Figur 2B). Im Gegensatz dazu war die Col- lagen I α 1 Expression unbeeinflusst. Ein zweiter spezifischer Proteasom-Inhibitor 20 MG262, welcher ein Boronatderivat von MG132 ist, inhibierte die Kollagenex- pression ähnlich effektiv (Figur 2B) und belegt somit die Spezifität der proteaso- malen Inhibition. Der Cathepsininhibitor ALLM, der als Peptid-Aldehyd (A- LLM-al) strukturell verwandt mit MG132 ist, zeigte demgegenüber keine Effekte auf die Kollagenexpression (Figur 2B).

25

Die endemisch auftretenden und gesundheitspolitisch extrem wichtigen Organ- fibrosen (besonders Herzmuskelfibrose) sind von extremen Varianten von Fibro- sebildungen in Form von Entzündungsreaktionen auf Fremdkörper völlig zu trennen (vergleiche auch Kapselbildung bei Silikonimplantaten), über die H. Rupp, P. 30 Newrzella, H. König und B. Maisch in: „Hemmung der kardialen Fibrose durch

Blockierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB“ auf der 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, 19.-21. April 2001, Mannheim, berichteten.

- 5 Speziell bei der millionenfach vorkommenden, erfindungsgemäß durch die Verabreichung von Proteasom-Inhibitoren zur Prävention oder Therapie behandelbare Herzmuskelfibrosierung ist das pathophysiologische Agens die neuroendokrine Aktivierung mit der Freisetzung vasokonstriktorischer Mediatoren wie Katecholamine, Angiotensin II, Endothelin-1, TGF-beta und anderen, die im Rahmen einer globalen Überlast (z. B. chronische Druckbelastung bei arterieller Hypertonie) oder einer regionalen Überlast (z. B. kompensatorische Hyperkinesie des intakten Restmyokards bei Myokardinfarkt) verstärkt liberiert werden. Neben ihren vasokonstriktorischen Eigenschaften haben diese Mediatoren massive wachstumsinduzierende Effekte im Sinne der Massenzunahme von Herzmuskelzellen und der Proliferation und vermehrten Syntheseleistung in Form von Extrazellulärmatrxbildung von kardialen Fibroblasten.

Bei den erfindungsgemäß mit Proteasom-Inhibitoren behandelten, durch Überlastungen geschädigten fibrotischen Herzen werden in der feingeweblichen Untersuchung in der Regel keine Hinweise auf eine inflammatorische Reaktion beobachtet. Es ist wissenschaftlich gut belegt, dass diese durch Überlast induzierten kardialen Fibrosen unabhängig von der Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NFkB sind und über die Signalkette des TGF-beta laufen (Siehe Kitamoto et al., Circulation 2000;102:806-12; Lijnen et al., Mol Gen Metab 2000;71:418-35). Die erfindungsgemäß durch Proteasom-Inhibitoren behandelbare kardiovaskulär relevante Fibrosierung wird folglich unabhängig von NFkB durch verschiedene Formen der Überlast mit konsekutiver neuroendokriner Aktivierung verursacht.

Diese Aussagen werden eindeutig dadurch gestützt, dass die wesentlichen Substanzgruppen, die gegen die Entwicklung einer Fibrose gerichtet sind, oder die zur Regression einer Fibrose beitragen, antagonistische Wirkungen auf spezifische vasoaktive Mediatoren haben. Gute Beispiele dafür sind Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitoren (ACE-Hemmer), Angiotensin II Typ 1-Rezeptor Antagonisten (AT-1-Antagonisten) und Endothelin-Rezeptorantagonisten.

Andere bevorzugte Ausführungsbeispiele von erfindungsgemäß mittels Proteasom-Inhibitoren behandelbaren Organfibrosen ohne dominierende inflammatorische Komponente sind stauungsbedingte Fibrosierung der Leber, Hochdruckbedingte Fibrosierung der Nieren, Gelenkfibrosen bei Fehlstellungen.

Experimentelle Daten der vorliegenden Erfindung belegen, dass die erfindungsgemäßen anti-fibrotischen Effekte von Proteasom-Inhibitoren unabhängig von der Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB sind.

1. Real-time PCR-Analyse der Expression von Kollagenen und MMP2 und 9 (Fig. 4):

Hierzu wurden kardiale Fibroblasten unter serum-freien Bedingungen 24 Stunden mit Proteasom-Inhibitoren behandelt und aus der präparierten RNA die Expression der Kollagene I α 1, I α 2 und III α 1 und von MMP2 und 9 mittels real-time RT-PCR bestimmt. Wie in Fig. 4C und 4D gezeigt, wurde durch die erfindungsgemäße Inhibition des Proteasoms nicht nur die Expression der Kollagene sondern auch die der MMPs deutlich inhibiert. Diese inhibitorische Wirkung der Proteasom-Inhibitoren war erfindungsgemäß unter basalen Bedingungen und ohne zusätzliche Zytokinstimulation der Zellen zu beobachten.

Um zu untersuchen, ob Proteasom-Inhibitoren auch nach Induktion der MMPs durch Stimulation mit dem NFκB-aktivierenden Zytokin Interleukin-1 β (IL-

- 14 -

1 β) diese Effekte zeigen, wurden die kardialen Fibroblasten mit IL-1 β und Proteasom-Inhibitor kostimuliert.

Die IL-1 β -Stimulation führte zu einer deutlichen Expressionssteigerung der MMPs, insbesondere von MMP9 (Fig. 4A). Diese MMP ist als eine durch NF κ B aktivierbare und durch Zytokinbehandlung stimulierbare Protease beschrieben (Gum et al., J Biol Chem. 1996; 271:10672-80). Die gleichzeitige Gabe von Proteasom-Inhibitoren verhinderte nicht nur den IL-1 β -induzierten Anstieg der Expression, sondern reduzierte überraschender Weise die Expression bis unter die DMSO-Kontrollwerte (Fig. 4A). Dies belegt die erfindungsgemäße Hemmung der Expression der MMPs durch Proteasom-Inhibierung, die zu einer stärkeren Hemmung der MMP-Expression führt als zu einer Hemmung der von IL-1 β vermittelten MMP-Expression und somit unabhängig von der Hemmung der Aktivierung von NF κ B ist.

15

Noch deutlicher konnte die erfindungsgemäße, von einer Inhibierung von NF κ B unabhängige Wirkung von Proteasom-Inhibitoren bei der erfindungsgemäßen Prävention und Behandlung von fibrotischen Erkrankungen in einer Analyse der Kollagenexpression unter IL-1 β Stimulation gezeigt werden (Fig. 20 4B).

Wie bereits von Siwik et al., (Siwik et al., Am J Physiol Cell Physiol. 2001;280:C53-C60) beschrieben, führte die IL-1 β Behandlung zu einer Herabregulation der Kollagenexpression in kardialen Fibroblasten (Fig. 4B). Diese Suppression lässt sich durch negativ regulatorische NF κ B-Elemente im Promotor der Kollagene, d.h. durch eine suppressorische Wirkung von aktivierte NF κ B auf die Expression der Kollagene, erklären (Kouba et al., J Immunol. 1999;162:3226-34). Die Kostimulation der Fibroblasten mit IL-1 β

- 15 -

und mit Proteasom-Inhibitoren resultierte jedoch nicht in einer Aufhebung dieser Suppression der Kollagene durch NF κ B, wie bei der Inhibierung der Aktivierung von NF κ B durch Proteasomeninhibitoren zu erwarten gewesen wäre, sondern führte überraschender Weise zu einer noch stärkeren Suppression der Kollagenexpression als mit IL-1 β alleine (Fig. 4B).

Die vorliegenden Untersuchungen belegen, dass die erfindungsgemäße Behandlung von fibrotischen Erkrankungen mittels Proteasominhibitoren unabhängig von der Inhibierung der Aktivierung von NF κ B ist. Vorteilhafter Weise ermöglicht die Erfindung die Inhibierung der Expression von MMPs und Kollagenen bei fibrotischen Erkrankungen unabhängig von der Inhibierung der Aktivierung von NF κ B. Vorzugsweise ermöglicht die Erfindung die Prävention und Behandlung von fibrotischen Erkrankungen, die nicht oder nicht vorrangig von NF κ B vermittelt werden.

15

2. Zymographie zum Nachweis von aktivem MMP2 und MMP9 (Fig. 5):

Die erfindungsgemäße Inhibierung der Expression aktiver MMP2 in kardialen Fibroblasten unter basalen, d.h. nicht durch NF κ B stimulierten, Bedingungen mittels Proteasom-Inhibitoren wurde auch in Zymographie-Experimenten bestätigt (Fig. 5). Hierzu wurden die Zellkulturüberstände nach Inkubation mit Proteasom-Inhibitoren in Abwesenheit (Fig. 5A) bzw. Anwesenheit (Fig. 5B) von IL-1 β bezüglich ihrer Gelatinase-Aktivität mittels Zymographie untersucht.

25

Erfindungsgemäß wurde die MMP2-Bildung durch den Proteasom-Inhibitor bereits in Abwesenheit von IL-1 β , d.h. unabhängig von NF κ B, verringert (Fig.

5A). Die durch IL-1 β induzierte MMP2- und MMP9-Aktivierung wurde durch gleichzeitige Gabe von Proteasom-Inhibitoren ebenfalls verringert (Fig. 5B).

3. Bandshift-Analyse zum Nachweis aktiven NF κ Bs (Fig. 6):

5

Die oben dargestellten Ergebnisse belegen, dass die erfindungsgemäßen inhibitorischen Wirkungen der Proteasom-Inhibitoren auf die Kollagen- und MMP-Expression bei unstimulierten kardialen Fibroblasten auftreten und deshalb unabhängig von der Inhibierung der Aktivierung von NF κ Bsind. Dies 10 wurde zusätzlich in Bandshift-Analysen mit Oligonukleotiden, die eine NF κ B-DNA-Bindungstelle aufweisen, bestätigt. Dazu wurden Kernextrakte von kardialen Fibroblasten hergestellt, die in einer Zeitreihe in An- und Abwesenheit von IL-1 β mit 0.5 μ M MG132 bzw. DMSO (Lösungsmittelkontrolle) behandelt wurden.

15

Wie in Fig. 6 gezeigt, weisen kardiale Fibroblasten unter nicht-stimulierten, basalen Bedingungen keinen aktiven NF κ B-Komplex auf (siehe Kontrollbändern). Unter IL-1 β -Stimulation kommt es zu einer Aktivierung von NF κ B, dargestellt als Bandshift. Die zeitgleiche Behandlung mit 0.5 μ M MG132 zeigte 20 erst nach 6 Stunden einen leichten inhibitorischen Effekt auf NF κ B, der die überraschend starke Verringerung der Expression von MMP2 und MMP9 bei der gleichzeitigen Gabe von MG132 und IL-1 β (s.o. Fig. 4A) nicht zu erklären vermag. Nach 24 Stunden war eine Verringerung der durch IL-1 β -induzierten Aktivierung von NF κ B mit und ohne MG132 zu beobachten.

25

Die in vitro Experimente belegen somit, dass die erfindungsgemäßen inhibitorischen Effekte von Proteasom-Inhibitoren auf die Expression von Kollagenen und

MMPs unabhängig vom inflammatorischen Transkriptionsfaktor NFκB vermittelt werden.

Auch die eingangs dargestellten Daten zur erfindungsgemäßen Verhinderung der kardialen Fibrose im Tiermodell der spontan hypertensiven Ratten belegen die erfindungsgemäße, von Entzündungsreizen unabhängige Suppression der Kollagenexpression durch MG132: Dieses Tiermodell geht erfindungsgemäß nicht von einem Entzündungsreiz als Auslöser für die kardiale Fibrose aus, sondern von einer ausgeprägten Hypertonie der Ratten.

10

Erfindungsgemäß greifen Proteasom-Inhibitoren nicht nur inhibierend in die Kollagen- und MMP-Expression ein, sondern zeigen ihr breites Wirkspektrum auch in der Suppression der Fibroblastenproliferation.

15 Die erfindungsgemäßen therapeutischen Interventionen umfassen vorzugsweise die systemische Gabe von Proteasom-Inhibitoren. Vorzugsweise wird dabei einem Patienten wenigstens ein Proteasom-Inhibitor in einer Dosis verabreicht, in der vorteilhafter Weise systemische Nebenwirkungen, insbesondere zytotoxische Nebenwirkungen, von Proteasom-Inhibitoren nicht oder nur in geringem Maße auftreten.

20 Die erfindungsgemäße Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Prävention und Therapie von Fibrosen ist deshalb gut verträglich, ermöglicht vorzugsweise eine spezifische anti-fibrotische Behandlung und ermöglicht somit eine erfindungsgemäße Prävention und Therapie bei einer Vielzahl von Patienten.

25 Bei bevorzugten Ausführungen ermöglicht eine erfindungsgemäße systemische Gabe wenigstens eines Proteasom-Inhibitors eine Prävention und Behandlung vorzugsweise einer kardialen Fibrose, vorzugsweise einer durch Überlast verursachten kardialen Fibrose, vorzugsweise einer durch Überlast bei chronischer

Druckbelastung bei arterieller Hypertension verursachten kardialen Fibrose, vorzugsweise einer durch Überlast bei kompensatorischer Hyperkinesie des intakten Restmyokards bei Myokardinfarkt verursachten kardialen Fibrose, vorzugsweise einer durch Überlast mit konsekutiver neuroendokriner Aktivierung verursachten kardialen Fibrose, vorzugsweise einer kardialen Fibrose, bei der eine Behandlung durch ACE-Hemmer, AT-1-Antagonisten und/oder Endothelin-Rezeptorantagonisten indiziert ist, vorzugsweise einer stauungsbedingten Fibrosierung der Leber, vorzugsweise einer Hochdruck-bedingten Fibrosierung der Nieren und vorzugsweise aller Gelenkfibrosen bei Fehlstellungen von Gelenken.

10

Bei der erfindungsgemäßen Prävention und der erfindungegemäßen Therapie von Fibrosen wird einem Patienten wenigstens ein Proteasom-Inhibitor, vorzugsweise in einer Dosierung von in etwa 0,5 µg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,5 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise in einer Dosierung von in etwa 1 µg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise in einer Dosierung von in etwa 0,01 mg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Diese Dosierungen beziehen sich auf alle hierin genannten Proteasom-Inhibitoren, insbesondere die Threoninprotease-Inhibitoren, insbesondere MG132 und MG262. Vorzugsweise wird wenigstens einer der hierin eingangs erwähnten Proteasom-Inhibitoren verabreicht, vorzugsweise MG132. Dabei werden vorzugsweise vorteilhafte Verabreichungsformen verwendet, die dem Fachmann bekannt sind, vorzugsweise feste und flüssige Arzneimittelzubereitungen, vorzugsweise Infusionslösungen, die vorzugsweise wenigstens einen vorteilhaften Arzneimittelzusatz enthalten, der dem Fachmann geläufig ist und der zur Verbesserung der Lagerfähigkeit und/oder der Verträglichkeit der Arzneimittelzubereitung beiträgt.

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung mindestens eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen, die nicht durch Entzündungsreaktionen auf Fremdkörper verursacht sind.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung einer durch Überlast verursachten kardialen Fibrose, einer stauungsbedingten Fibrosierung der Leber, einer Hochdruck-bedingten Fibrosierung der Nieren oder einer Gelenkfibrose bei Fehlstellung eines Gelenks.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 2 zur Behandlung einer durch Überlast bei chronischer Druckbelastung bei arterieller Hypertension verursachten kardialen Fibrose und/oder zur Behandlung einer durch Überlast bei kompensatorischer Hyperkinesie des intakten Restmyokards bei Myokardinfarkt verursachten kardialen Fibrose.
- 20 4. Verwendung nach Anspruch 2 oder 3 zur Behandlung einer kardialen Fibrose, bei der eine Behandlung durch ACE-Hemmer, AT-1-Antagonisten und/oder Endothelin-Rezeptorantagonisten indiziert ist.
- 25 5. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, wobei einem Patienten wenigstens ein Proteasom-Inhibitor in einer Dosierung von in etwa 0,5 µg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,5 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise von in etwa 1 µg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise von in etwa 0,01 mg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht verabreicht wird.

6. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die fibrotischen Erkrankungen fibrotische Erkrankungen von Organen, vorzugsweise von Lunge, Leber, Haut, Gelenke, Skelett und/oder Drüsen betreffen, insbesondere Erkrankungen des kardiovaskulären Systems.
7. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasom-Inhibitor eine niedermolekulare organische Verbindung oder eine molekularbiologische Verbindung ist.
8. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasom-Inhibitor ein Threoninprotease-Inhibitor, ein Serinprotease-Inhibitor, ein Cysteinprotease-Inhibitor, ein Genexpressionsinhibitor des proteasomalen Systems und/oder ein Bindeprotein oder -peptid gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems, vorzugsweise gegen Ubiquitin und/oder gegen das Proteasom, ist.
9. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasom-Inhibitor ein Peptid-Aldehyd, ein Peptid-Boronat, ein Peptid-Vinylsulfon, ein Peptid-Epoxyketon, ein Lactacystin, ein Peptid-alpha-Ketoaldehyd, ein alpha-Ketoamid, ein Indanonpeptid, ein Polyalkylenaldehyd, ein Polyphenol, insbesondere ein Cathechin-3-gallat, eine Nukleinsäure gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems und/oder ein Antikörper oder ihre bindeaktiven Teile oder Derivate davon gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems ist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 8-10, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasominhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132), Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al (PSI), CEP1612, Pyrazylcarbonyl-Phe-Leu-boronat (PS-341), Dansyl-Phe-Leu-boronat (DFLB), Morpholinonaphthylalanin-

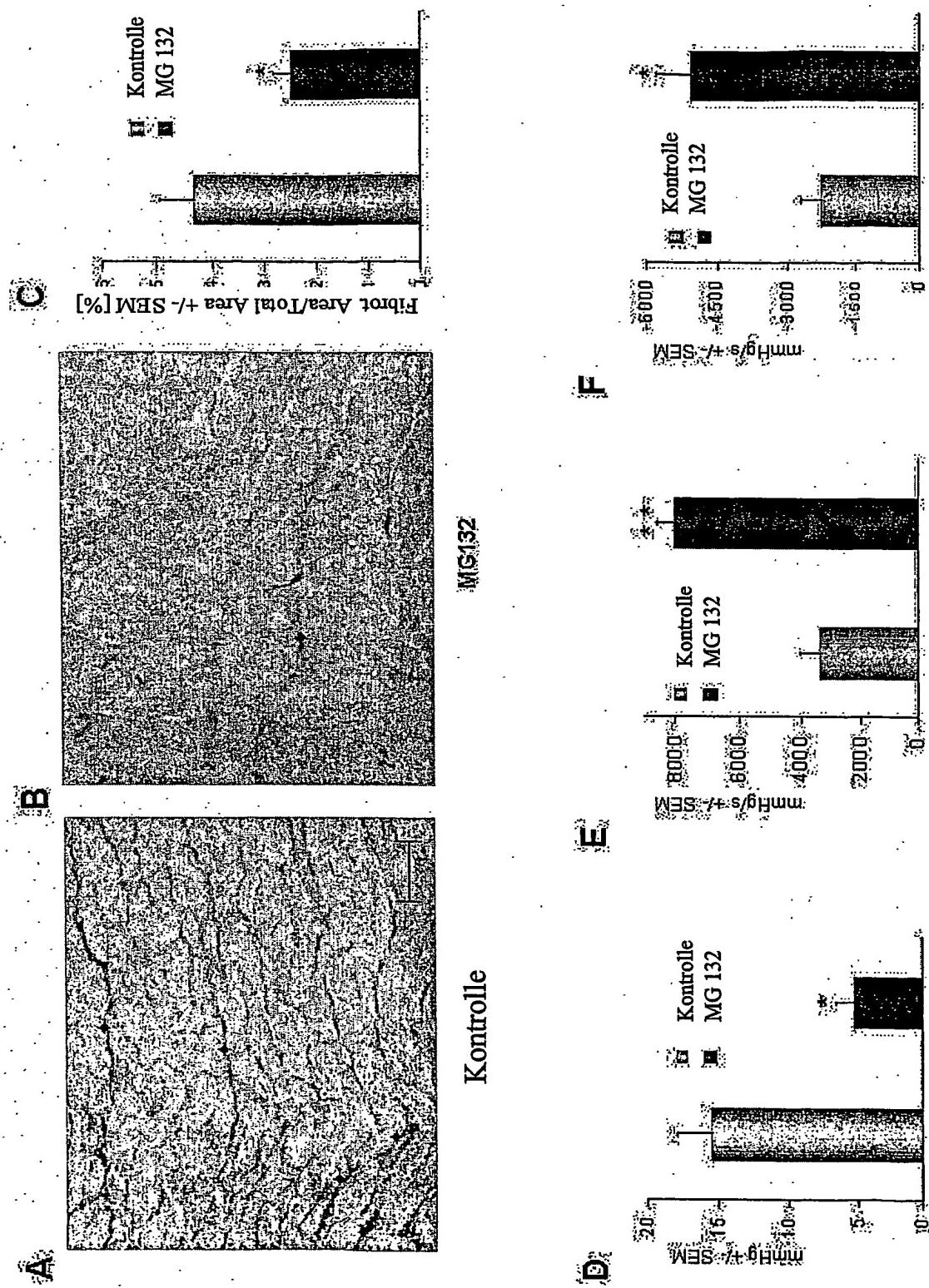
- 21 -

Leu-boronat (MG273), NIP-Leu₃-vinylsulfon (NLVS), Tyr-Leu₃-VS, NIP-Leu-Leu-Asn-VS, Ada-Tyr-Ahx₃-Leu₃-VS, Ada-Lys(Bio)-Ahx₃-Leu₃-VS Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-EX (Epoxomicin), Dihydroeponemycin, Lactacystin, clasto-Lactacystin-beta-lacton (Omuralid), PS-519, Ac-Leu-Leu-Nle-al (ALLN), 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI), 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (Pefablock SC), TMC-95A, Gliotoxin, (-)Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Ritonavir, Lovastatin, Aclacinomicin A (Aclarubicin), Cyclosporin, anti-sense-RNA oder Doppelstrang-RNA (dsRNA) gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz, Triplex-bildendes Oligonukleotid gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz und/oder ein Knock-out-Konstrukt gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz ist, worin Z eine Benzyloxycarbonylgruppe, al eine Aldehydgruppe, VS eine Vinylsulfongruppe, NIP eine 3-Nitro-4-hydroxy-5-iodophenylacetat-Gruppe und Bio eine Biotingruppe bedeutet.

15

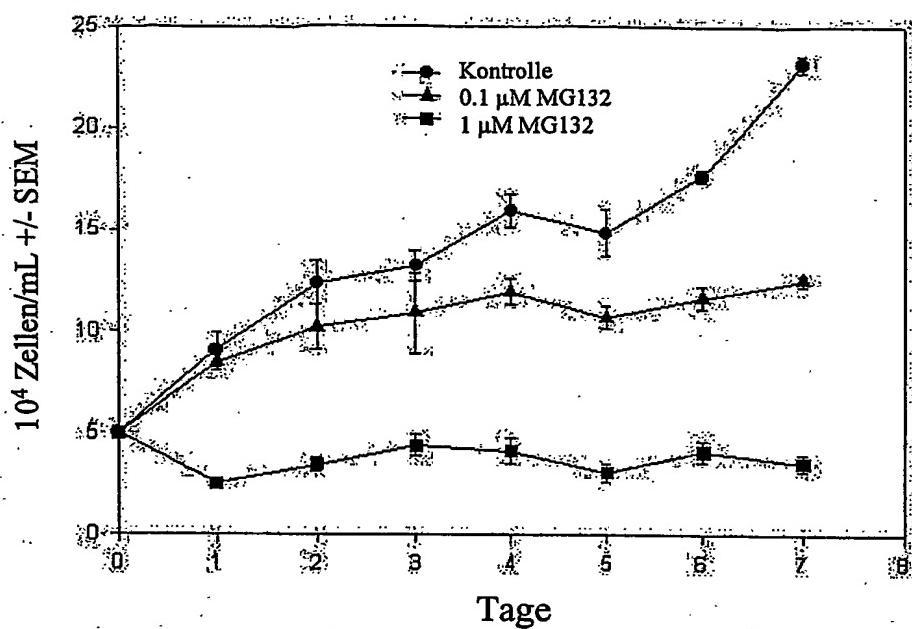
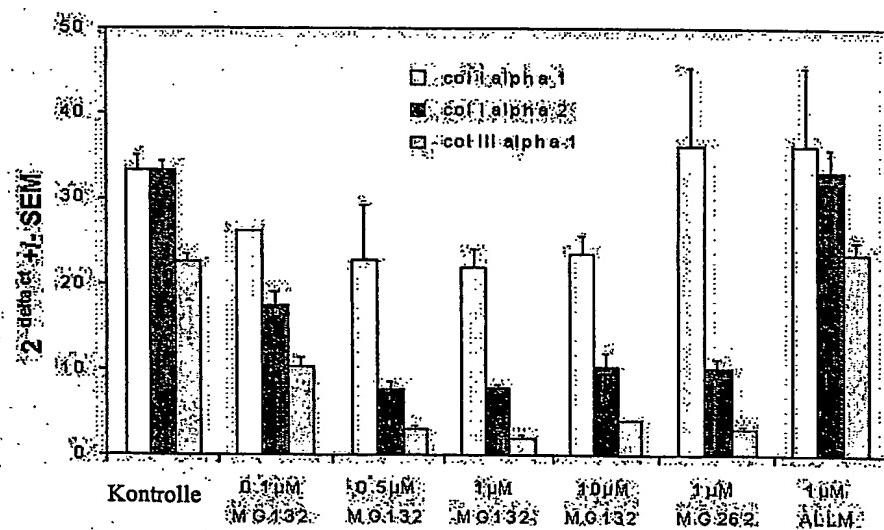
1 / 7

Fig. 1



2 / 7

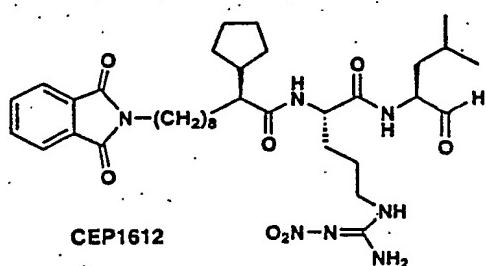
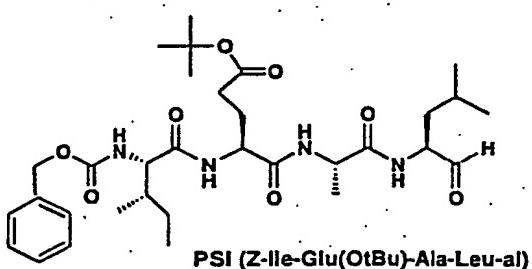
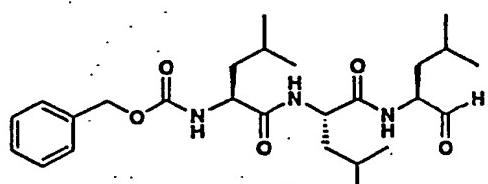
Fig.2

A**B**

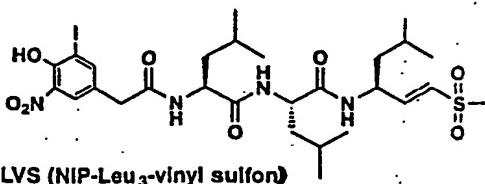
3 / 7

Fig. 3 A

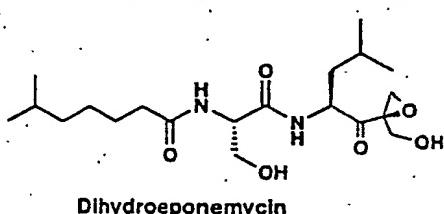
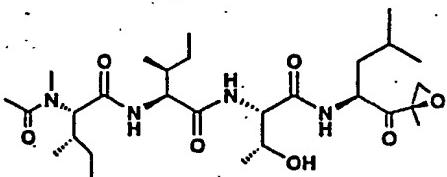
PEPTID-ALDEHYDE



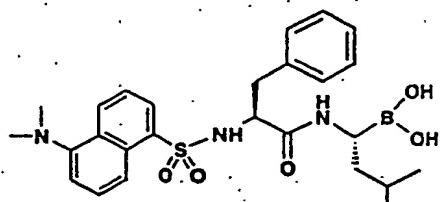
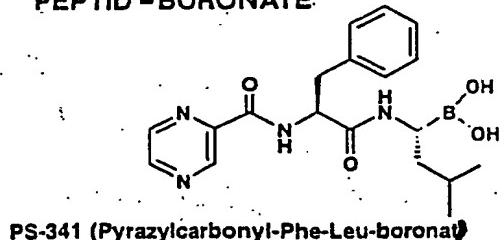
PEPTID-VINYL SULFONE



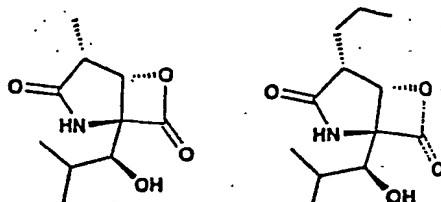
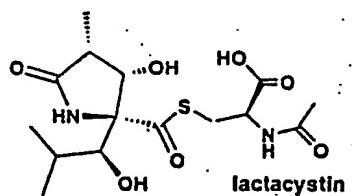
PEPTID-EPOXYKETONE



PEPTID-BORONATE

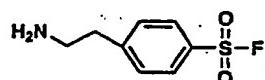
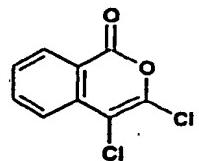
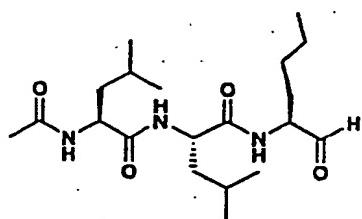
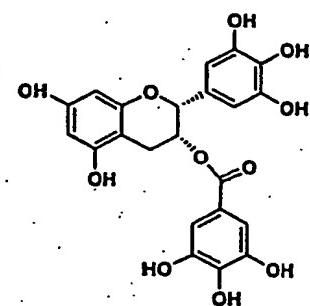
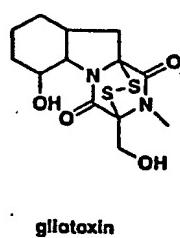
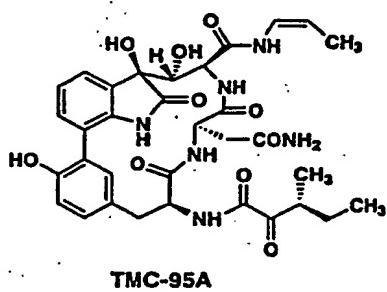


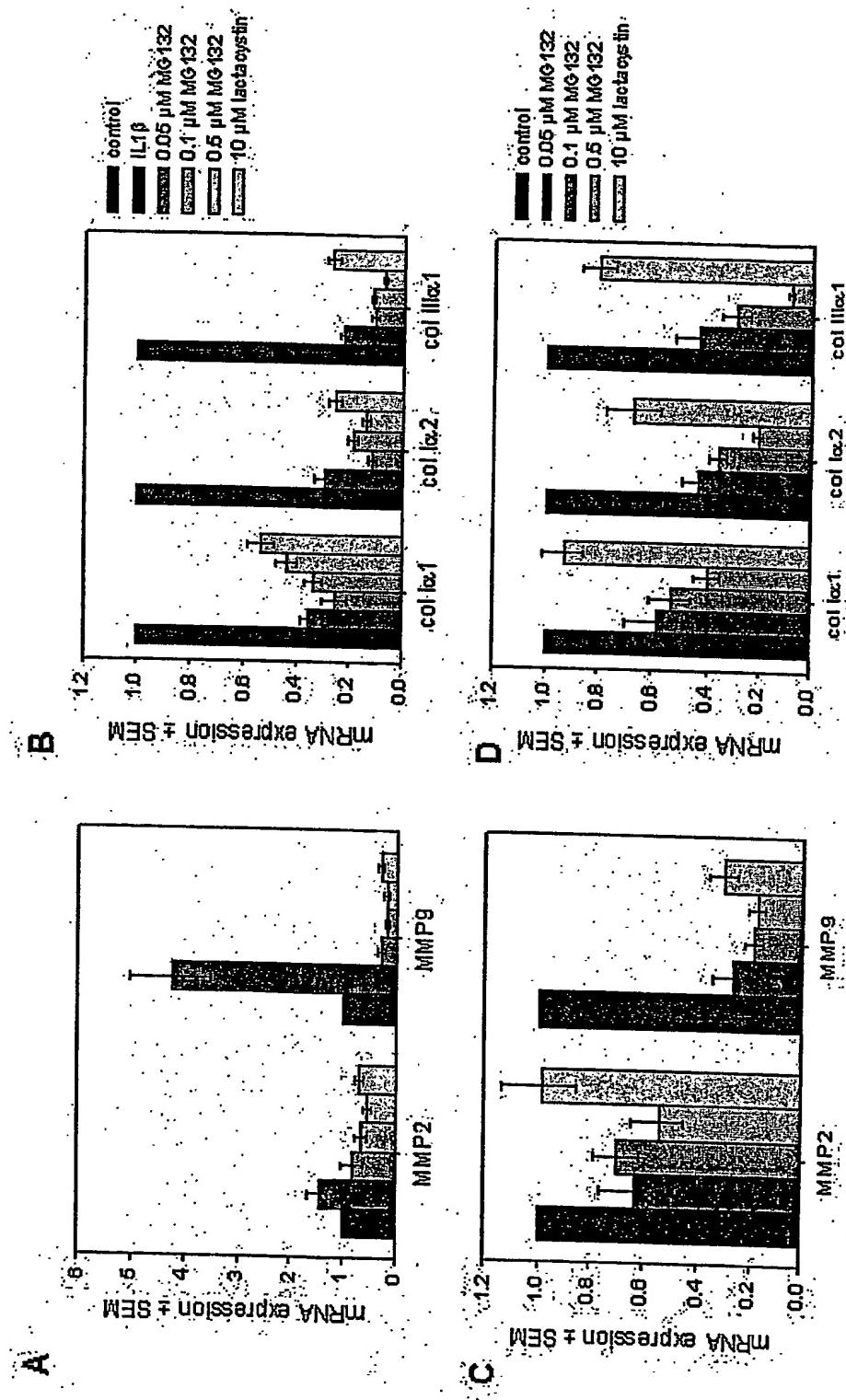
LACTACYSTINE



4 / 7

Fig. 3 B



**Fig. 4**

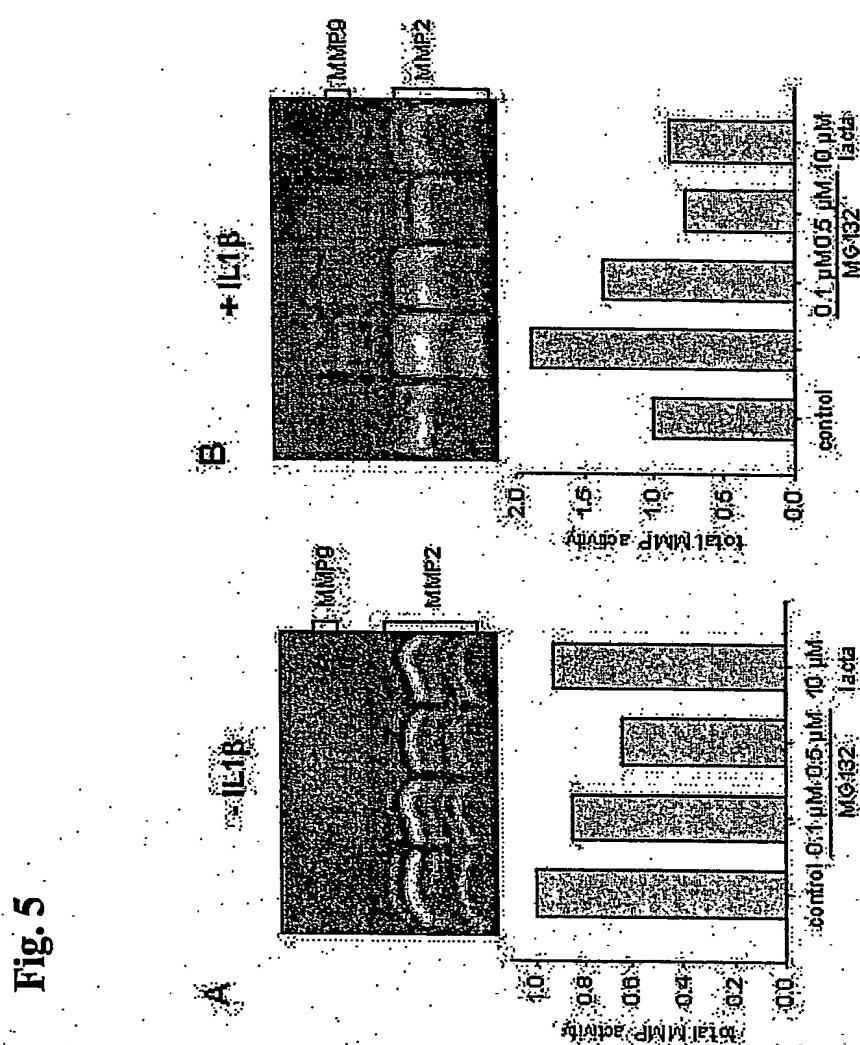


Fig. 5

7 / 7

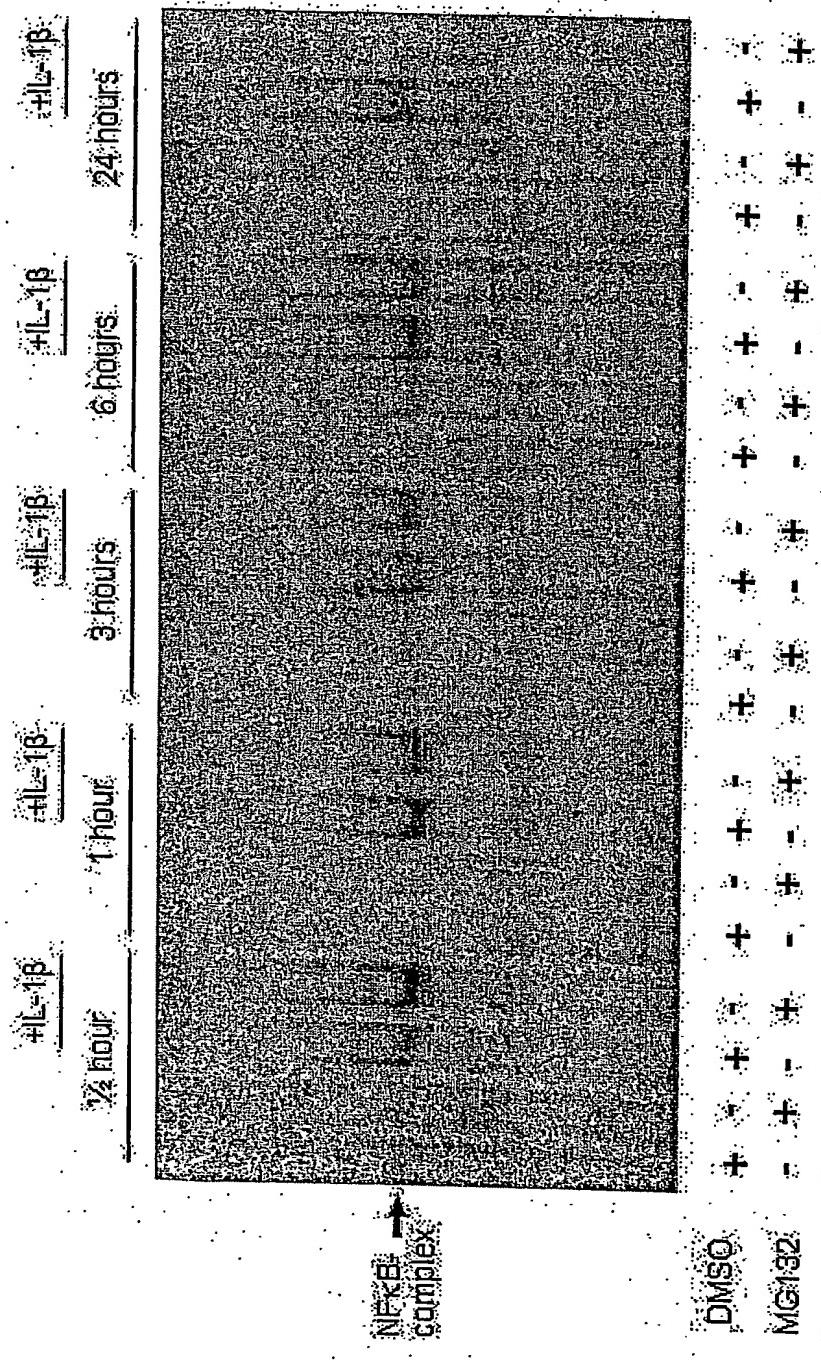


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/08205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02 12196 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO ; SUTTON JAMES C JR (US); ZHAO GUOHUA (US);) 14 February 2002 (2002-02-14) claim 12 ---	1-8
X	US 6 255 453 B1 (KAWABATA KAZUHITO ET AL) 3 July 2001 (2001-07-03) column 1, line 15-35,52; claim 1 ---	1
X	WO 98 08825 A (PROCTER & GAMBLE) 5 March 1998 (1998-03-05) page 16, paragraph 4 page 17, line 14,15; claim 9 ---	1
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2003

Date of mailing of the International search report

15/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ludwig, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat... Application No
PCT/EP 03/08205

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; June 2001 (2001-06) OKUNO MASATAKA ET AL: "Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta" Database accession no. PREV200100309222 XP002262872 abstract & GASTROENTEROLOGY, vol. 120, no. 7, June 2001 (2001-06), pages 1784-1800, ISSN: 0016-5085 -----</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/08205

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0212196	A	14-02-2002	US 6344450 B1 AU 8064201 A CA 2418995 A1 EP 1309609 A2 WO 0212196 A2	05-02-2002 18-02-2002 14-02-2002 14-05-2003 14-02-2002
US 6255453	B1	03-07-2001	US 6001813 A US 6001814 A US 2002010315 A1 AU 4330899 A AU 4415899 A EP 1089752 A1 EP 1135151 A1 JP 2003520185 T WO 0032216 A1 WO 9962538 A1 US 2003176642 A1	14-12-1999 14-12-1999 24-01-2002 19-06-2000 20-12-1999 11-04-2001 26-09-2001 02-07-2003 08-06-2000 09-12-1999 18-09-2003
WO 9808825	A	05-03-1998	AT 231132 T AU 4073997 A AU 731319 B2 AU 4152997 A BR 9712086 A BR 9713185 A CN 1228773 A CN 1232457 A CZ 9900623 A3 CZ 9900627 A3 DE 69718480 D1 DK 925287 T3 EP 0923563 A1 EP 0925287 A1 HU 0000505 A2 HU 0000591 A2 JP 2000515166 T JP 2000516252 T KR 2000035917 A KR 2000035923 A NO 990760 A NO 990839 A NZ 334252 A NZ 334253 A PL 331856 A1 PL 331900 A1 SK 25199 A3 SK 25699 A3 TR 9900400 T2 TR 9900428 T2 WO 9808827 A1 WO 9808825 A1 US 2003186958 A1 US 6545038 B1 US 6166005 A ZA 9707694 A ZA 9707695 A	15-02-2003 19-03-1998 29-03-2001 19-03-1998 24-10-2000 03-11-1999 15-09-1999 20-10-1999 14-07-1999 14-07-1999 20-02-2003 12-05-2003 23-06-1999 30-06-1999 28-07-2000 28-04-2001 14-11-2000 05-12-2000 26-06-2000 26-06-2000 27-04-1999 28-04-1999 24-11-2000 24-11-2000 16-08-1999 16-08-1999 14-02-2000 08-10-1999 21-05-1999 21-06-1999 05-03-1998 05-03-1998 02-10-2003 08-04-2003 26-12-2000 23-02-1998 23-02-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International Patentenzeichen
PCT/EP 03/08205

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K38/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02 12196 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO ; SUTTON JAMES C JR (US); ZHAO GUOHUA (US);) 14. Februar 2002 (2002-02-14) Anspruch 12 ---	1-8
X	US 6 255 453 B1 (KAWABATA KAZUHITO ET AL) 3. Juli 2001 (2001-07-03) Spalte 1, Zeile 15-35,52; Anspruch 1 ---	1
X	WO 98 08825 A (PROCTER & GAMBLE) 5. März 1998 (1998-03-05) Seite 16, Absatz 4 Seite 17, Zeile 14,15; Anspruch 9 ---	1
	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

27. November 2003

15/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ludwig, G

INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Intern
PCT/EP 03/08205

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Juni 2001 (2001-06) OKUNO MASATAKA ET AL: "Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta" Database accession no. PREV200100309222 XP002262872</p> <p>Zusammenfassung & GASTROENTEROLOGY, Bd. 120, Nr. 7, Juni 2001 (2001-06), Seiten 1784-1800, ISSN: 0016-5085</p> <p>-----</p>	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Patentanzeichen

PCT/EP 03/08205

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0212196	A	14-02-2002	US	6344450 B1		05-02-2002
			AU	8064201 A		18-02-2002
			CA	2418995 A1		14-02-2002
			EP	1309609 A2		14-05-2003
			WO	0212196 A2		14-02-2002
US 6255453	B1	03-07-2001	US	6001813 A		14-12-1999
			US	6001814 A		14-12-1999
			US	2002010315 A1		24-01-2002
			AU	4330899 A		19-06-2000
			AU	4415899 A		20-12-1999
			EP	1089752 A1		11-04-2001
			EP	1135151 A1		26-09-2001
			JP	2003520185 T		02-07-2003
			WO	0032216 A1		08-06-2000
			WO	9962538 A1		09-12-1999
			US	2003176642 A1		18-09-2003
WO 9808825	A	05-03-1998	AT	231132 T		15-02-2003
			AU	4073997 A		19-03-1998
			AU	731319 B2		29-03-2001
			AU	4152997 A		19-03-1998
			BR	9712086 A		24-10-2000
			BR	9713185 A		03-11-1999
			CN	1228773 A		15-09-1999
			CN	1232457 A		20-10-1999
			CZ	9900623 A3		14-07-1999
			CZ	9900627 A3		14-07-1999
			DE	69718480 D1		20-02-2003
			DK	925287 T3		12-05-2003
			EP	0923563 A1		23-06-1999
			EP	0925287 A1		30-06-1999
			HU	0000505 A2		28-07-2000
			HU	0000591 A2		28-04-2001
			JP	2000515166 T		14-11-2000
			JP	2000516252 T		05-12-2000
			KR	2000035917 A		26-06-2000
			KR	2000035923 A		26-06-2000
			NO	990760 A		27-04-1999
			NO	990839 A		28-04-1999
			NZ	334252 A		24-11-2000
			NZ	334253 A		24-11-2000
			PL	331856 A1		16-08-1999
			PL	331900 A1		16-08-1999
			SK	25199 A3		14-02-2000
			SK	25699 A3		08-10-1999
			TR	9900400 T2		21-05-1999
			TR	9900428 T2		21-06-1999
			WO	9808827 A1		05-03-1998
			WO	9808825 A1		05-03-1998
			US	2003186958 A1		02-10-2003
			US	6545038 B1		08-04-2003
			US	6166005 A		26-12-2000
			ZA	9707694 A		23-02-1998
			ZA	9707695 A		23-02-1998